

COLO

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD  
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)

(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

|  |  |   |
|--|--|---|
| Referencia del expediente del solicitante o del mandatario   | <b>PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN</b>                                     | Véase formulario PCT/IPEA/416   |
| Solicitud internacional N°<br><b>PCT/IB2004/004224</b>   | Fecha de presentación internacional (día/mes/año)<br><b>(21.12.2004)</b> | Fecha de prioridad (día/mes/año)<br><b>23 DICIEMBRE 2003 (23.12.2003)</b> |
| Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o a la vez clasificación nacional e IPC<br><b>VER HOJA ADICIONAL</b> |  |   |
| Solicitante<br><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>   |  |   |

1. El presente informe preliminar internacional sobre patentabilidad, se establece por esta Administración encargada del examen preliminar internacional según el Artículo 35 y se transmite al solicitante conforme al Artículo 36.
2. Este INFORME comprende 6 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden:
- a. ☒ (remitido al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de 15 hojas, descritas a continuación:
- ☒ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).
- ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Recuadro I y en el Recuadro Suplementario.
- b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de soporte(s) electrónico(s)) \_\_\_\_\_, que contiene una lista de secuencias y/o tabla(s) relativas(s), solo en formato electrónico, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los puntos siguientes:
- ☒ Recuadro I Base de este informe
- ☐ Recuadro II Prioridad
- ☐ Recuadro III No formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial
- ☐ Recuadro IV Falta de unidad de invención
- ☒ Recuadro V Declaración motivada según el Artículo 35.2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración
- ☐ Recuadro VI Ciertos documentos citados
- ☐ Recuadro VII Defectos en la solicitud internacional
- ☒ Recuadro VIII Observaciones relativas a la solicitud internacional

|  |  |
|--|--|
| Fecha de presentación de la solicitud de examen preliminar internacional<br><b>04 OCTUBRE 2005 (04.10.2005)</b>  | Fecha de finalización del presente informe<br><b>30 NOVIEMBRE 2005 (30.11.2005)</b>    |
| Nombre y dirección postal de la Administración encargada del examen preliminar internacional<br><b>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS<br/>C/ Panamá, 1 - 28071 Madrid (España)</b><br>N° de fax: 91 349 53 04 | Funcionario autorizado<br><b>Polo Díez, Ana Isabel</b><br>N° de teléfono: 91 349 55 24 |

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE  
PATENTABILIDAD

Solicitud internacional N°

PCT/IB2004/004224

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.  
☐ Este informe está basada en una traducción del idioma original al siguiente idioma \_\_\_\_\_, que es el de una traducción proporcionada a los fines de:  
☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1.b))  
☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)  
☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)
2. Por lo que respecta a los **elementos** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:  
☐ la solicitud internacional tal y como fue inicialmente presentada/enviada  
☒ la descripción:  
páginas 1,2,4, 8-10,12,15,19,26, tal como se presentaron/enviaron inicialmente  
páginas \* 3,5,6,7,11,13,14,16,17,18 recibidas por esta Administración en fecha 04/10/2005  
páginas \* \_\_\_\_\_ recibidas por esta Administración en fecha \_\_\_\_\_  
☒ las reivindicaciones:  
páginas \_\_\_\_\_, tal como se presentaron/enviaron inicialmente  
páginas \* \_\_\_\_\_, modificadas (acompañadas de una declaración) según el artículo 19  
páginas \* 20-24 recibidas por esta Administración en fecha 04/10/2005  
páginas \* \_\_\_\_\_ recibidas por esta Administración en fecha \_\_\_\_\_  
☐ Los dibujos:  
páginas \_\_\_\_\_, tal como se presentaron/enviaron inicialmente  
páginas \* \_\_\_\_\_ recibidas por esta Administración en fecha \_\_\_\_\_  
páginas \* \_\_\_\_\_ recibidas por esta Administración en fecha \_\_\_\_\_  
☐ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) - ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias
3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la anulación de:  
☐ la descripción, páginas \_\_\_\_\_  
☐ Las \_\_\_\_\_ reivindicaciones, \_\_\_\_\_ N°s  
☐ Los \_\_\_\_\_ dibujos, \_\_\_\_\_ hojas/fig.  
☐ la lista de secuencias (*precisar*) \_\_\_\_\_  
☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (*precisar*) \_\_\_\_\_
4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2.c)).  
☐ la descripción, páginas \_\_\_\_\_  
☐ Las reivindicaciones, N°s \_\_\_\_\_  
☐ Los dibujos, hojas/fig. \_\_\_\_\_  
☐ la lista de secuencias (*precisar*) \_\_\_\_\_  
☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (*precisar*) \_\_\_\_\_

\* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida"

**INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE  
PATENTABILIDAD**

Solicitud internacional N°

**PCT/IB2004/004224**

**Recuadro V. Declaración motivada según el Artículo 35.2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

1. Declaración

|                       |                  |       |    |
|-----------------------|------------------|-------|----|
| Novedad               | Reivindicaciones | 1-18  | SÍ |
|                       | Reivindicaciones | _____ | NO |
| Actividad inventiva   | Reivindicaciones | 1-18  | SÍ |
|                       | Reivindicaciones | _____ | NO |
| Aplicación industrial | Reivindicaciones | 1-18  | SÍ |
|                       | Reivindicaciones | _____ | NO |

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

Documentos tenidos en consideración.

| Doc. | Número Publicación o Identificación                           | Fecha Pub. |
|------|---|------------|
| D01  | Manca; M.C. et al. Milchwissenschaft, 1985, vol 40 (7)        | 1985       |
| D02  | WO 0157234 A2   | 2001       |
| D03  | De Vuyst, L.D. et al. International Dairy Journal, vol 11 (9) | 2001       |

1. Novedad y actividad inventiva:

La reivindicación independiente 1 de la solicitud de patente se refiere a un biopolímero de glucosa y fructosa (que se obtiene utilizando un preparado enzimático que produce la cepa de *Lactococcus lactis* NRLL B-300656). En la reivindicación figuran una serie de características física y químicas del biopolímero, entre ellas la proporción existente entre los monosacáridos glucosa y fructosa que es de 0,2 a 0,7, y el peso molecular del biopolímero que se encuentra entre 900-1100 Kd.

En la reivindicación 2 se protege el método de producción del preparado enzimático a partir del microorganismo *Lactococcus lactis* NRLL B-300656. Las reivindicaciones 3-7 son reivindicaciones dependientes en las que se dan detalles del método de producción. Este preparado enzimático, que muestra actividad con actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa se utiliza para obtener el biopolímero anteriormente reivindicado.

La reivindicación 8 se refiere al método de producción del biopolímero de la primera reivindicación incubando el preparado enzimático que se ha obtenido en las reivindicaciones 2 a 7. El procedimiento consiste en incubar el extracto enzimático en las condiciones adecuadas y luego recuperar y purificar el biopolímero. La reivindicación 9 detalla las condiciones de incubación del preparado enzimático y la 10 y la 11, dos métodos para recuperar y purificar el biopolímero.

La reivindicación 12 a 15 se refiere a la cepa bacteriana *Lactococcus lactis* NRLL B-300656. La reivindicación 15 se refiere al mismo microorganismo pero conservado.

Por último, las reivindicaciones 16 a la 18 mencionan los posibles usos del biopolímero en la industria.

Continúa en página siguiente...

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE  
PATENTABILIDAD

Solicitud internacional N°

PCT/IB2004/004224

Continuación Recuadro V. Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El documento **D1** divulga un polisacárido extracelular de unas 1000 hexosas, compuesto por glucosa y fructosa, con una proporción glucosa/fructosa del 0,5, valor que se encuentra dentro del intervalo de que tiene el biopolímero de la solicitud. Sin embargo, el peso molecular de este heteropolisacárido es de 197 Kilodalton, es decir menor que el de la invención. El microorganismo que produce el biopolímero es una bacteria láctica pero de otra especie, concretamente *Lactobacillus bulgaricus*.

En **D2** se describe una cepa de *Lactococcus lactis* que produce un heteropolisacárido pero cuya composición es de glucosa y galactosa. Además de otros genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis del heteropolisacárido, el microorganismo dispone de genes que codifican las enzimas galactosiltransferasa y glucosiltransferasa.

El documento **D3** es una revisión sobre los heteropolisacáridos producidos por bacterias lácticas. La mayoría de los biopolímeros están compuestos por glucosa, galactosa y ramnosa, habiéndose encontrado sólo un caso en que la fructosa esté presente. Las biosíntesis de estos compuestos requieren, además de las transferasas para los monosacáridos que componen el heteropolisacárido, un conjunto de enzimas con otras funciones como son las transportadoras, polimerizadoras, etc.

En ningún documento del estado de la técnica se describe un biopolímero como el de la reivindicación 1, ni un microorganismo de la especie *Lactobacillus lactis* capaz de producir un preparado enzimático con actividad glucosiltransferasa y de fructosiltransferasa. Tampoco existen indicaciones en el estado de la técnica que haga pensar que un microorganismo de la especie *Lactococcus lactis* vaya a producir este biopolímero ni este preparado enzimático.

Por consiguiente, se considera que las reivindicaciones independientes 1, 2 y 12 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva. Por ello también son nuevas y con actividad inventiva las reivindicaciones dependientes 3-7 y 13-15.

Tanto el procedimiento de obtención de un biopolímero nuevo (reivindicación 8 y dependientes 9-11) como los usos del mismo (reivindicaciones 16-18) se pueden considerar también nuevas y con actividad inventiva.

## 2. Aplicación industrial.

Todas las reivindicaciones (1-18) tienen aplicación industrial.

**Recuadro VIII. Observaciones relativas a la solicitud internacional**

Se formulan las observaciones siguientes sobre la claridad de las reivindicaciones, de la descripción y de los dibujos y sobre si las reivindicaciones se fundan totalmente en la descripción:

1. Algunas reivindicaciones no están basadas en la descripción o existe discrepancia entre los datos de la descripción y de las reivindicaciones.

Por ejemplo:

- Reivindicación 3: En la descripción, en la página 5, se habla de la activación del microorganismo que se lleva a cabo de 20 a 40°C. En la página 11, se emplea la temperatura de 30°C. No se encuentran más datos en la descripción que permitan una reivindicación donde la temperatura sea de 25°C.

- Reivindicación 4: La etapa de fermentación aparece mencionada en la página 5 donde se da la aireación (0,1-1 vvm) y el pH (5-9). Se vuelven a dar las condiciones de fermentación en la tabla de la página 13. La aireación que se da en la tabla está fuera del rango de la que se dice anteriormente. El tiempo que se da en esta tabla es de 6-12 horas mientras que se reivindica de 12 a 36 horas, tiempo que está fuera de rango del descrito.

- Reivindicación 5: La centrifugación para recuperar la enzima es de 3000-10000 rpm en la página 6 y de 3000 a 7000 rpm en la reivindicación 5.

Reivindicación 6: En la página 11 el tiempo de preparación de preinóculos es de 12 a 24 horas y no de 12 a 36 horas como en la reivindicación 6.

- Reivindicación 7: Se detallan las concentraciones de los componentes del medio, pero en la última parte se dice que se incuban de 10 a 36 horas y se repiten las condiciones de pH, etc ¿Este tiempo a qué etapa se refiere y en dónde está de la descripción?

- Reivindicación 10: La temperatura del aire de secado del biopolímero es de 50-80°C en la reivindicación pero el único dato a este respecto en la descripción es de 60°C en la página 7 y de 60-80°C en la página 14.

2. Falta de claridad en algunas reivindicaciones:

- Reivindicación 1: El preámbulo de la invención es poco claro. Se trata de una reivindicación de producto (un biopolímero) caracterizado por sus características físicas y químicas. El procedimiento por el que se obtiene no aporta características al mismo, luego no es relevante en esta reivindicación. Si quiere mantener el origen del biopolímero póngalo de una manera más clara por ejemplo, como está en la página 3, líneas 1-3 "Biopolímero producido por un extracto enzimático con actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa obtenido de la cepa *Lactobacillus lactis*. NRRL B-30656" caracterizado porque el biopolímero.....

- Las reivindicaciones 16-18 se refieren a usos del biopolímero y deberían ser enunciadas como usos

**OPINIÓN ESCRITA DE LA  
ADMINISTRACIÓN DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL**

Solicitud internacional N°

**PCT/IB2004/004224**

**CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD**

***C12P 19/04*** (2006.01)

***C12P 19/98*** (2006.01)

***C08B 37/00*** (2006.01)

***C12N 1/20*** (2006.01)

***C12N 9/10*** (2006.01)

***A23L 1/054*** (2006.01)

04.10.2005

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El propósito principal de esta invención es proveer un biopolímero, producido por un extracto o preparado enzimático con actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, producido a partir de una cepa de *Lactococcus lactis*, NRRL B-30656, caracterizada por su alta actividad de transferencia, lo cual permite obtener el biopolímero mediante un método de producción sencillo y fácil de escalar. Su producción consiste en los siguientes pasos: **Fase 1:** Fermentación con la cepa de *Lactococcus lactis*, NRRL B-30656 en un medio de cultivo desarrollado para el crecimiento de este microorganismo. **Fase 2:** La recuperación de la enzima extracelular mediante centrifugación o ultrafiltración. **Fase 3.** La producción del biopolímero mediante la reacción enzimática utilizando sacarosa como sustrato y el extracto o preparado enzimático. **Fase 4:** La purificación del biopolímero mediante precipitación con solventes o ultrafiltración y posterior secado del producto.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El objeto de la invención es producir un biopolímero puro, libre de contaminantes polisacáridicos. El biopolímero se describe como un polímero producido por una cepa de *Lactococcus lactis* aislada del suelo. Esta cepa tiene alta actividad de transferencia, lo cual permite obtener el biopolímero mediante un proceso sencillo, y con una pureza mayor del 95%.

**El microorganismo.** En la presente invención la cepa de *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, fue aislada del suelo mediante un proceso selectivo utilizando un medio que contenía sacarosa como fuente de carbono, en el cual, los microorganismos productores de un extracto o preparado enzimático con actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa son capaces de utilizar el sustrato y producir polímeros otorgando aspecto mucoso a la colonia. De este medio, son seleccionados los microorganismos con estas características y purificados mediante técnicas de aislamiento por diluciones sucesivas y

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

| Componente                             | Concentración g/l |
|--|-------------------|
| Sales                                  |                   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 7-30              |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O  | 0.01-1            |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O  | 0.01-0.1          |
| MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O   | 0.001 – 0.1       |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 0.001 – 0.01      |
| NaCl                                   | 0.01-0.1          |
| Fuente de Carbono                      |                   |
| Sacarosa                               | 10-40             |
| Fuente de Nitrógeno                    |                   |
| Extracto de levadura                   | 7-30              |

El pH es ajustado a pH 5-9 con HCl. El medio se esteriliza a 121°C por quince minutos.

**Fermentación.** Los pre-inóculos corresponden al 5-20% del volumen del inóculo, son activados a partir de la cepa pura conservada a -70°C en medio con glicerol al 20%; el tiempo de incubación no supera las 10-36 horas, período en el cual se debe verificar la pureza del pre-inóculo. Estos cultivos se realizan en frascos con agitación, ocupando un 5-20% del volumen total e incubándolos a 20-40°C con agitación de 100-400 rpm en agitadores orbitales. De acuerdo con el número y tamaño de los fermentadores, se determina el número de inóculos necesarios.

Las condiciones de crecimiento, y producción de la enzima son: temperatura: 20-40°C, agitación: 100 – 400 rpm (dependiente de la escala de fermentación),

**Aireación.** El microorganismo que promueve la fermentación es aerobio, por lo cual el cultivo debe ser aireado con 0.1 –1 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (vvm) y el pH se mantiene entre 5 y 9 durante la fermentación. Como resultado de este proceso productivo se tienen medios de cultivo con

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA



combinaciones de componentes para alcanzar una concentración final entre 10-30 g/l de biomasa, peso húmedo, con una actividad de transferencia de 2-6 U/ml, la cual se logra en un tiempo de 6-24 horas.

**Recuperación de la enzima.** La enzima extracelular se recupera del medio de cultivo fermentado por centrifugación a 3.000 -10.000 rpm por 15 minutos o filtración para separar la biomasa. De este modo el extracto o preparado enzimático presenta una actividad de glucosiltransferasa y fructosiltransferasa de 2-6 U/ml.

### **Producción del biopolímero**

**Reacción enzimática.** Las condiciones de la reacción son las siguientes:

#### **Medio de reacción:**

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Buffer fosfatos 50-300 Mm pH | : 5-9.  |
| Sustrato                     | : sacarosa 5-40%.                             |
| Cantidad de enzima           | : 10-40% v/v extracto o preparado enzimático. |
| Tiempo de reacción           | : 12-48 horas                                 |
| Agitación                    | : 100-400 rpm                                 |

### **Recuperación y purificación del biopolímero**

Después de la reacción enzimática la temperatura se disminuye a 4°C y el biopolímero puede ser recuperado de dos formas:

#### **a) Precipitación con solventes**

A la mezcla de reacción fría se adiciona etanol al 96%, con agitación. La cantidad de etanol adicionada corresponde a 1.2- 2.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

El biopolímero-precipitado se redisuelve en la mitad del volumen de agua desionizada y destilada y se precipita nuevamente con 1.2 - 2.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.

El biopolímero precipitado se redisuelve en un tercio del volumen de agua y se seca por liofilización o secado por aire forzado a 60°C, hasta una humedad del 5-6%.

#### b) Ultrafiltración

La mezcla de reacción se somete a un proceso de ultrafiltración en una membrana de celulosa regenerada con un tamaño de poro mayor de 10.000 Daltons, con el fin de eliminar la glucosa y fructosa residuales. Posteriormente el biopolímero se somete a un proceso de secado por aspersión.

El biopolímero se caracteriza por cromatografía líquida de alta eficiencia y por la viscosidad de una solución al 10% a 30°C. El biopolímero presenta un tiempo de retención de 7 - 7.5 minutos empleando una columna Shodex SC1011, a una temperatura de 70°C, un flujo de 0.6 ml/min, y agua grado HPLC como fase móvil.

La viscosidad de una solución al 10% a 30°C, empleando un viscosímetro ViscoEasy, Serie L, Schott, Ref. 28.541.120, vástago L2, 50 rpm, se encuentra en un rango de 1000-3000 centipoises (cP).

El tamaño promedio de partícula "dvs" (diámetro / volumen / superficie) es de 224 micras. El biopolímero tiene una densidad verdadera cercana a la de sacarosa (1.5 mg/ml). Es un material que presenta una alta porosidad interparticular del 48%.

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

**EJEMPLO 2****PRODUCCIÓN DEL EXTRACTO O PREPARADO ENZIMÁTICO****1. Fermentación:****a) Activación del microorganismo**

Para la obtención del extracto o preparado enzimático con actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa se empleó el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656. La bacteria fue almacenada en una solución crioprotectora (glicerol) a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La cepa fue descongelada lentamente a temperatura ambiente y activada en 50 ml de medio de sacarosa a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, y 180 r.p.m. de agitación. Con 5 ml de este cultivo se realizaron dos tipos de siembras, la primera: en agar sacarosa, incubándose a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, observándose las características mucoides, y almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ ; la segunda: en 100 ml de caldo sacarosa, incubándose a  $30^{\circ}\text{C}$  por 12 horas; este último fue distribuido en tubos de centrifuga con una capacidad de 1 ml, con 20% V/V de glicerol y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  utilizados para las posteriores fermentaciones. A los 45 ml del cultivo inicial restante, se conservaron en viales de 5 ml, mediante liofilización, utilizando leche descremada estéril como soporte, en una concentración de 10% y almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**b) Preparación de preinóculos e inóculos**

Se preparan preinóculos con la misma composición del medio correspondiente al lote; se toma el microorganismo conservado en medio sacarosa sólido, se siembra en un volumen de medio líquido, al 5-20% del volumen del inóculo, se cultivan a  $25-35^{\circ}\text{C}$ , con agitación de 100-400 r.p.m durante 12-24 horas.

**Composición del medio utilizado:**

| Componente | Concentración g/l |
|------------|-------------------|
| Sales:     |                   |

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

04.10.2005

**Condiciones de operación de los fermentadores**

| Condiciones  | 14 l    |
|--|---------|
| Volumen de Medio (l)                                 | 10      |
| Relación Volumen de Medio / Volumen del Fermentador. | 0.8     |
| Porcentaje de Inóculo                                | 5-10    |
| Densidad óptica de Inoculación                       | 0.5-1   |
| Agitación (r.p.m)                                    | 100-400 |
| Temperatura (°C )                                    | 25-35   |
| Aireación (v.v.m)                                    | 1-3     |
| pH Inicial del medio                                 | 5-8     |
| Tiempo de Fermentación (Horas)                       | 6-12    |

**2. Recuperación de la enzima:****a) Centrifugación.**

La enzima extracelular se recupera por centrifugación a 5.000 rpm por 15 minutos para separar la biomasa. El extracto o preparado enzimático con actividad de glucosiltransferasa y fructosiltransferasa de 2 – 6 U/ml.

**b) Ultrafiltración.**

Otra manera de recuperar el sobrenadante de la fermentación es mediante el uso de membranas de ultra filtración con tamaños de poro 0.22-2 micras.

**EJEMPLO 3****Producción y recuperación del Biopolímero.**

**a) Reacción enzimática.** Las condiciones de la reacción son las siguientes:

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

04.10.2005

Medio de reacción:

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Buffer fosfatos 50-200 Mm pH | : 5 - 7   |
| Sustrato                     | : sacarosa 8-20%.   |
| Cantidad de enzima           | : 10-30% v/v extracto o preparado<br>enzimático ( 200- 500U/l). |
| Tiempo de reacción           | : 20-40 horas   |
| Agitación                    | : 100-400 rpm   |

La enzima es separada por centrifugación, se coloca en un medio que contiene de 8-20% de sacarosa, a pH 5-8 y temperatura de 25-35°C, por 20-30 horas obteniendo una concentración de polímero de 30-60 g/l, correspondiente a 40-60% de rendimiento respecto al sustrato. En otros procesos reportados se requieren 5-10 días para la producción del polímero. Los microorganismos reportados producen concentraciones menores de polímero, tabla 1.

**b) Purificación del biopolímero.**

Después de la reacción enzimática la temperatura se disminuye a 4°C y el biopolímero puede ser recuperado de dos formas:

- **Precipitación con solventes.** A la mezcla de reacción fría se adiciona etanol al 96%, con agitación. La cantidad de etanol adicionada corresponde a 1.2-2.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.
- El biopolímero precipitado se redisuelve en la mitad del volumen de agua desionizada y destilada y se precipita nuevamente con 1.2 a 2.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.
- El biopolímero precipitado se redisuelve en un tercio del volumen de agua y se seca por liofilización o secado por aire forzado a 60-80°C hasta una humedad del 5-10%.

**TABLA 1****Producción de EPS por diferentes microorganismos.**

| Organismo | Biopolímero (g/100 ml) |
|-----------|------------------------|
|-----------|------------------------|

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

**c) Secado**

El producto final obtenido es un polvo blanco, que puede ser secado por liofilización o por calor seco a una temperatura no mayor a 80°C.

**EJEMPLO 4****Caracterización del Biopolímero****1. Solubilidad.**

El producto es un biopolímero hidrosoluble capaz de formar dispersiones homogéneas tipo hidrogel hasta una concentración máxima de 50%. 1.0 g de biopolímero se disuelve en 32 ml de ácido clorhídrico al 5%, en 50 ml de hidróxido de sodio al 10%, en 30 ml de ácido acético glacial.

Es Insoluble en: etanol, isopropanol, acetona, aceite mineral, aceite vegetal y polietilenglicol.

El producto es medianamente soluble en ácido oxálico al 0.5% a temperatura de ebullición.

**2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).**

- En cromatografía de permeación una solución de biopolímero al 1.5% presenta un peso molecular de 900-1.100 kDa, determinado en una columna Shodex OHPak KB-803. Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes:

|             |                          |
|-------------|--------------------------|
| Temperatura | : 55°C                   |
| Fase Móvil  | : Solución de NaCl 0.1 M |
| Flujo       | : 0.9 ml/min             |

**HOJA DE SUSTITUCIÓN****HOJA MODIFICADA**

- La pureza del polímero es mayor al 95%, evidenciada por un pico delgado en HPLC bajo las siguientes condiciones:

Columna marca Shodex SC1011

Fase móvil : agua destilada desionizada.

Flujo : 0.6 ml/min.

Temperatura : 70°C.

Equipo : Waters 510 con detector de índice de refracción marca Waters 2410.

Bajo estas condiciones el biopolímero presenta un tiempo de retención de 7 a 7.5 minutos.

Los patrones utilizados fueron glucosa, fructosa y sacarosa, grado reactivo analítico.

- El biopolímero es estable en un amplio rango de pH evidenciado por HPLC después de contacto del polímero con buffers de pH 2-9.

### 3. Viscosidad.

Se determinó la viscosidad de una solución al 10% a 30°C, empleando un viscosímetro ViscoEasy, Serie L, Schott, Ref. 28.541.120, vástago L2, 50 rpm, Las muestras analizadas presentaron una viscosidad en un rango de 1000-3000 centipoises (cP). Exhibe un comportamiento pseudo plástico (adelgazamiento al corte). La viscosidad de las soluciones del biopolímero disminuye al aumentar la velocidad de corte o cizalla, e incrementa al disminuir la temperatura.

### 4. Características dimensionales.

El biopolímero tiene una densidad verdadera cercana a la de sacarosa (1.5 mg/ml). Es un material que presenta una alta porosidad interparticular del 48%. El tamaño promedio de partícula "dvs" (diámetro / volumen / superficie) es de 224 micras.

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

### 5. Adsorción de humedad

La capacidad de adsorción de agua oscila entre 6.12 mg/g y 353.20 mg/g dependiendo de la humedad relativa; esto lo hace un material ligeramente higroscópico. Gracias a su estructura polimérica e hidrofiliidad, el biopolímero tiene la capacidad de esponjarse ilimitadamente al contacto con agua, siendo capaz de formar sistemas de consistencia variable dependiendo de la cantidad de agua incorporada, hasta dar lugar a la formación de dispersiones acuosas características por su alta viscosidad

### 6. Humedad

Presenta pérdidas por secado en estufa de vacío a 60° C no mayores del 10%.

### 7. Características térmicas

El biopolímero presenta dos puntos de transición vítrea; el primero entre 20 y 30°C y el segundo entre 190 y 220°C, determinados mediante calorimetría diferencial de barrido.

### 8. Calidad microbiológica

El biopolímero presenta los siguientes recuentos microbiológicos:

| Carga microbiológica           | Rango       | Unidad   |
|--------------------------------|-------------|----------|
| Recuento de mesófilos viables. | 2000 - 4000 | ufc / gr |
| Recuento de coliformes.        | Ausencia    | nmp / gr |
| Recuento coliformes fecales.   | <10         | nmp / gr |
| Recuento de salmonella.        | Ausencia    |          |
| Recuento de Mohos y levaduras. | 2000 - 5000 | ufc / gr |

### 9. Usos.

- a) El biopolímero puede ser empleado en la Industria Farmacéutica como viscosante, espesante, estabilizante, dispersante, como formador de

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA



## REIVINDICACIONES

### Nosotros reclamamos

1. Un biopolímero de glucosa y fructosa obtenido a partir de productos del metabolismo de una cepa de *Lactococcus lactis* depositada bajo el código NRRL B-30656, en donde los productos del metabolismo, consisten en un extracto o preparado enzimático con dos tipos de actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, y en donde el biopolímero que tiene una composición que mantiene una relación glucosa/fructosa entre 0.2 y 0.7, se caracteriza porque presenta las siguientes propiedades:

- peso molecular 900-1100 Kilodaltons,
- dos puntos de transición vítrea, el primero entre 20 y 30°C y el segundo entre 190 y 220°C,
- estabilidad en soluciones acuosas con valores de pH entre 2 y 9,
- viscosidad entre 1000 y 3000 centipoises cuando el polímero se encuentra en una concentración de 10 a 20% en una solución acuosa a temperatura de 30°C
- no higroscópico.
- altamente soluble en agua, capaz de formar dispersiones homogéneas tipo hidrogel hasta una concentración máxima de 50% peso /volumen.

2. Un método de producción del extracto o preparado enzimático con dos tipos de actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, producidas por la cepa de *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, que consiste en:

- a) Activar el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, empleando un medio que contiene sacarosa como fuente de carbono, proteínas como fuente de nitrógeno y sales minerales.

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

—b)—Fermentar—el—microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 empleando un medio de cultivo que contiene sacarosa como fuente de carbono proteínas como fuente de nitrógeno y sales minerales.

c) Separar el extracto o preparado enzimático a partir del medio fermentado empleando centrifugación o ultrafiltración.

3. El método de producción del extracto o preparado enzimático de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la etapa de activar el microorganismo se lleva a cabo inoculando un medio que contiene sacarosa como fuente de carbono, proteínas como fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras fuentes de nitrógeno) y sales minerales, el cual se incuba por 10-36 horas a 25°C, a 100-400 rpm y pH 5 a 9.

4. El método de la reivindicación 2, en donde la etapa de fermentar el microorganismo se lleva a cabo cultivando el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 empleando un medio de cultivo que contiene sacarosa como fuente de carbono, proteínas como fuente de nitrógeno (extracto o preparado enzimático de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras fuentes de nitrógeno) y sales minerales,  $K_2HPO_4$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , NaCl, el cual se incuba por 12-36 horas a 25°C, a 100-400 rpm, 0.1 – 1 vvm y pH 5 a 9.

5. El método de la reivindicación 2, en donde la etapa de separar el extracto o preparado enzimático se lleva a cabo separando el extracto o preparado enzimático a partir del medio fermentado centrifugando la suspensión del microorganismo a 3000 a 7000 rpm.

6. El método de producción del extracto o preparado enzimático, de acuerdo con la reivindicación 2, en donde en la etapa de fermentación con el microorganismo se puede llevar a cabo realizando un preinóculo con el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 empleando un medio de cultivo que contiene sacarosa como fuente de carbono, proteínas como fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

fuentes de nitrógeno) y sales minerales,  $K_2HPO_4$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $NaCl$ , y el cual se incubó por 12-36 horas a  $25^\circ C$ , a 100-400 rpm, 0.1 – 1 vvm y pH 5 a 9.

7. El método de producción del extracto o preparado enzimático con actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la sacarosa como fuente de carbono se encuentra en concentraciones de 10 – 40 g/l, y las proteínas como fuente de nitrógeno se encuentran en concentraciones de 7 a 30 g/l y las sales minerales se encuentran en concentraciones de:  $K_2HPO_4$  (7-30 g/l),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.01 – 1 g/l),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.01 – 0.1 g/l),  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0.001 – 0.1 g/l),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.001 – 0.01 g/l), y  $NaCl$  (0.01 – 0.1 g/l), y el cual se incubó por 10 a 36 horas a  $25^\circ C$ , a 100 - 400 rpm y pH 5 a 9.

8. Un método de producción de un polímero de glucosa y fructosa de la reivindicación 1, que consiste en:

a) Incubar el extracto o preparado enzimático con actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, obtenido por fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en un medio que contiene sacarosa como fuente de carbono, bajo condiciones adecuadas de agitación, temperatura, pH, concentración del extracto o preparado enzimático y sustrato y tiempo de reacción, para la producción del biopolímero.

b) Recuperar y purificar el biopolímero por precipitación o ultrafiltración.

9. El método de producción del biopolímero, de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la etapa de incubar el extracto o preparado enzimático consiste en:

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA

— — — — — Incubar el extracto o preparado enzimático en un medio que contiene sacarosa como fuente de carbono, bajo condiciones adecuadas de agitación (100-400 rpm), temperatura, pH (5 a 9), concentración de extracto o preparado enzimático (10-40% v/v extracto o preparado enzimático) y sustrato (5-40%) y tiempo de reacción (12-48 horas), para la producción del biopolímero.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 8 en donde la etapa de recuperar y purificar el biopolímero por precipitación consiste en:

- Adicionar a la mezcla de reacción fría 1.2 - 2.0 volúmenes de etanol al 96%, con agitación (la cantidad de etanol adicionada corresponde a vol. de etanol por vol. de mezcla de reacción).
- Disolver el biopolímero precipitado en la mitad del volumen de agua desionizada y destilada y se precipita nuevamente con 1.2 a 2.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.
- Disolver el biopolímero precipitado en un tercio del volumen de agua y secar por liofilización o secado por aire forzado de 50 a 80°C hasta una humedad del 5-6%.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 8 en donde la etapa de recuperar y purificar el biopolímero por ultrafiltración consiste en: realizar un proceso de ultrafiltración con la mezcla de reacción empleando una membrana de celulosa regenerada con un tamaño de poro mayor de 10.000- 30.000 Daltons, con el fin de eliminar la glucosa y fructosa residuales, y someter el biopolímero a un proceso de secado por aspersión.

12. Un microorganismo de la cepa de *Lactococcus lactis*, aislado de suelos colombianos, depositado bajo el código NRRL B-30656.

13. El microorganismo descrito en la reivindicación 12, el cual produce el extracto o preparado de enzimas con dos tipos de actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa.

14. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 12 utilizado para producir el biopolímero mencionado en la reivindicación 1.

15. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 12, el cual se conserva en un medio de sacarosa con glicerol al 20% a -70°C y por liofilización empleando leche descremada al 10%.

16. El biopolímero de acuerdo con la reivindicación 1, el cual se utiliza en la Industria Farmacéutica como viscosante, espesante, estabilizante, dispersante, formador de películas, desintegrante, sustituto de plasma sanguíneo, agente de lubricación y agente prebiótico.

17. El biopolímero de acuerdo con la reivindicación 1, el cual se utiliza en la Industria de Alimentos como espesante, viscosante, estabilizador, dispersante, fibra y sustituto de grasas, aceites y carbohidratos basados en éteres y ésteres.

18. El biopolímero de acuerdo con la reivindicación 1, el cual se utiliza en productos obtenidos por extrusión, para formar películas aptas para producir empaques flexibles y biodegradables y en la obtención de productos desechables biodegradables, obtenidos por inyección o por moldeo y en la producción de agentes floculantes para el tratamiento de aguas.

HOJA DE SUSTITUCIÓN

HOJA MODIFICADA